

«УТВЕЖДАЮ»

ВРИО Директора ФГБУН

НИИ молекулярной биологии и биофизики

доктор биологических наук

В.А. Мордвинов

«8» октября 2015 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Серёгина Сергея Викторовича «Оптимизация конструкций рекомбинантных ДНК для получения иммунобиологических препаратов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность диссертационной работы

Возникновение, развитие и совершенствование методов генетической инженерии открыло новые горизонты в биологических и медицинских науках. Одним из главных, вполне осязаемых, достижений можно считать получение многих биологически активных веществ (БАВ) в виде рекомбинантных белков и пептидов. К ним относятся гормоны, цитокины и другие белковые факторы, которые обеспечивают согласованность действия различных систем организма человека в норме и при различных патологиях. Получение таких белков в рекомбинантном виде зачастую является единственным способом создания на их основе новых медицинских

препаратов для диагностики, профилактики заболеваний и лечения различных патологических состояний.

Решение таких задач напрямую связано с разработкой новых и усовершенствованием существующих систем клонирования и экспрессии генетического материала, оптимизацией рекомбинантных молекул ДНК, разработкой эффективных методов выделения целевых белков из клеточной биомассы продуцентов.

Отсутствие эффективных противовирусных препаратов оставляет вакцинопрофилактику едва ли не единственным специфическим средством сдерживания некоторых опасных вирусных инфекционных заболеваний, к которым можно отнести ВИЧ/СПИД и ККГЛ. Однако эффективные и безопасные вакцины против этих опасных инфекций до сих пор не разработаны, что предопределяет актуальность этого направления научных исследований.

Перспективным решением поставленной задачи следует признать создание ДНК-вакцин – нового подхода к вакцинопрофилактике вирусных инфекционных заболеваний, основанного на достижениях генетической инженерии. Определяющую роль в создании таких вакцин играет усовершенствование существующих и разработка новых генетических конструкций, на основе которых возможно получение рекомбинантных молекул ДНК, обладающих желаемыми свойствами, обеспечивающими эффективную защиту от конкретных вирусных инфекций.

Совершенно очевидно, что для решения таких задач необходимо обладать знаниями о генетическом и антигенном разнообразии того или иного инфекционного агента, для чего желательно применять современные надежные методы его обнаружения в биологических образцах с последующей максимально возможной детальной характеристикой.

Целью представленной работы являлось конструирование рекомбинантных векторных плазмид, обеспечивающих эффективность клонирования и экспрессии различных генов, получение на их основе оригинальных рекомбинантных плазмид, направляющих в бактериальных клетках эффективный синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодуляторов; создание и оптимизация серии генетических конструкций, предназначенных для получения перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ, а также разработка современных методов экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах.

Новизна и практическая значимость полученных результатов исследования

В данной работе сконструированы оригинальные рекомбинантные векторные плазмиды, в том числе pRTU1, содержащие эффективные транскрипционные элементы и обеспечивающие клонирование и высокий уровень экспрессии различных генов в клетках *E. coli*. В вышеназванной плазмиде этот эффект достигается за счет наличия сильного индуцибельного промотора гена *recA* *Proteus mirabilis*, *trpA*-терминатора *E. coli* и расположенного между ними протяженного полилинкерного участка с большим набором уникальных сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции.

С использованием векторной плазмиды pRTU1 созданы эффективные бактериальные штаммы-продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: IL-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из IL-2 человека и цитотоксической А-субъединицы токсина шигеллы; анафилатоксина C5a человека; ангиогенина человека; белка вируса

натуральной оспы (ВНО), гомологичного рецептору γ -IFN человека, двух штаммов – высоковирулентного и слабовирулентного. Причем химеротоксины ILA и AIL, а также вышеназванные белки ВНО получены и изучены впервые.

В представленной работе осуществлено получение рекомбинантной плазмиды pcDNA-TCl, содержащей под контролем CMV-промотора искусственный ген TCl, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1, который также был синтезирован в ходе выполнения данной работы. Эта генетическая конструкция в настоящее время успешно используется в ГНЦ ВБ «Вектор» для создания новых вакцинных препаратов против ВИЧ-1. Сама рекомбинантная ДНК и полученные на ее основе перспективные вакцинопрофилактические препараты защищены тремя патентами Российской Федерации.

В продолжение ДНК-вакцинной тематики разработана и сконструирована серия оригинальных векторных плазмид (pV1, pV2, pV3) на основе pcDNA3.1-семейства, обеспечивающая эффективное получение набора кандидатных ДНК-вакцин с целью сравнительного изучения различных аспектов их вакцинного потенциала, в частности, для изучения влияния убиквитинзависимой презентации эпитопов иммуногенов по пути МНС-I класса, индуцирующей ответы CD8⁺ CTL, на иммуногенность.

На основе векторов pV1, pV2, pV3, получен набор рекомбинантных плазмидных ДНК, предназначенных для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ-1 и ККГЛ, основанный на девяти искусственных генах полиэпитопных CTL-иммуногенов, обеспечивающих различные стратегии процессинга и презентации эпитопов ВИЧ-1, и трех генах структурных белков вируса ККГЛ, кодирующих нуклеокапсидный белок N и зрелые поверхностные гликопротеины Gn и Gc. Особо следует отметить, что потенциально кандидатные вакцины ориентированы на применение в Российской Федерации благодаря выбору генов, типичных для

биовариантов ВИЧ-1 и вируса ККГЛ, циркулирующих на территории нашей страны в настоящее время.

Таким образом, в диссертационной работе изложены новые научно обоснованные генно-инженерные и биотехнологические решения, внедрение которых может внести значительный вклад в развитие страны, в частности, в области здравоохранения.

Структура диссертации

Диссертация написана по классическому принципу и состоит из следующих разделов: список сокращений, общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список работ, опубликованных по теме диссертации, и список литературы (включает 532 источника, из которых 74 опубликованы в отечественных изданиях). Работа изложена на 311 страницах формата А4 (межстрочный интервал – 1,5; кегль шрифта – 13), содержит 65 рисунков и 11 таблиц, оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ 7.32-2001 и ГОСТ 8.417-2002.

Раздел «Обзор литературы» состоит из двух подразделов. В первом приведены этапы становления генетической инженерии в хронологическом порядке и кратко охарактеризованы современные экспрессионные системы с акцентом на методы получения, клонирования и экспрессии целевых генов в прокариотической системе. Второй раздел посвящен созданию и перспективам использования ДНК-вакцин. Особое внимание автор уделил истории разработок различных вакцин против ВИЧ/СПИД и современному состоянию исследований в этом направлении с акцентом на создание и клинические испытания ДНК-вакцин как вакцин будущего.

В разделе «Материалы и методы исследования» дается подробное описание реактивов, материалов и использованных методик, порой чересчур подробно, хотя вряд ли это можно считать существенным недостатком работы. Материалы этого раздела в целом изложены очень логично, четко и последовательно.

Раздел «Результаты и обсуждение» в целом выглядит хорошо, построение материала вполне логично. Каждый подраздел открывает небольшая глава, кратко характеризующая объект исследования и включающая литературные данные, имеющиеся к моменту начала работы. Такую подачу материала, на мой взгляд, можно считать оправданной, поскольку это способствует лучшему пониманию логики работы.

В разделе «Заключение» суммированы основные результаты исследований. Достоверность выводов не вызывает сомнения, - они хорошо обоснованы, логически вытекают из представленных данных и соответствуют поставленным задачам исследования.

Выводы, сделанные автором, соответствуют полученным результатам. Они свидетельствуют, что цель работы достигнута, и поставленные задачи успешно решены. Список работ, опубликованных по теме диссертации, выглядит солидно – 35 научных статей в ведущих отечественных и зарубежных журналах, 8 патентов РФ на изобретения.

Список использованной литературы составлен очень аккуратно и грамотно. Особо хочется отметить, что автор уделил достаточно внимания публикациям в российских научных изданиях – их насчитывается 73.

Диссертация написана ясным и понятным языком. Работа хорошо проиллюстрирована рисунками и графиками, демонстрирующими результаты исследований, а также рационально составленными таблицами.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет, однако, можно отметить, что подробный исторический экскурс по возникновению генетической инженерии (стр. 21-43) в целом выглядит недостаточно сфокусированным для диссертационной работы с технологической направленностью. Создается ощущение, что этот фрагмент (или его часть) был написан довольно давно, о чем, в частности, свидетельствует несколько странное утверждение, что РНК-зависимая ДНК-полимераза является недавно открытым ферментом (стр. 28).

Результаты представленной диссертации полностью отражены в опубликованных материалах: научные статьи и тезисы конференций, а также патенты РФ на изобретения. Полный список включает 35 статей, опубликованных в отечественных и зарубежных научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертаций, 8 патентов РФ на изобретения, а также более 30 других изданий (сборники статей, журналы, не вошедшие в список ВАК, материалы конференций и других научных мероприятий).

Аннотация полностью отражает содержание диссертации.

Высказанные замечания несколько не умаляют достоинств рецензируемой работы. Объем полученных результатов, как и самих научных исследований, весьма значителен. Квалификация автора как специалиста в области генетической инженерии не вызывает никаких сомнений, как и ценность представленных им результатов.

Заключение

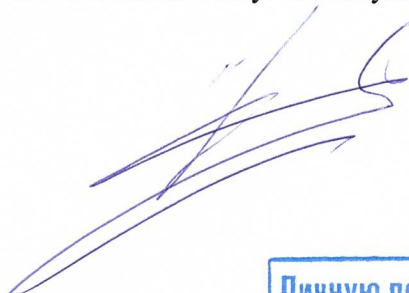
Диссертация Серёгина Сергея Викторовича «Оптимизация конструкций рекомбинантных ДНК для получения иммунобиологических препаратов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является законченной научно-исследовательской работой. Работа

соответствует требованиям ВАК РФ (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Серёгин Сергей Викторович, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв обсуждён и одобрен на семинаре Лаборатории генно-инженерных методов исследований НИИ молекулярной биологии и биофизики 24 сентября 2015 года.

Составитель:

Коваленко Сергей Петрович, доктор биологических наук, доцент, руководитель лаборатории генно-инженерных методов исследований ФГБУН «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»



Иванов С.В.